

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-288098

(43) 公開日 平成4年(1992)10月13日

| (51) Int. Cl. <sup>5</sup> | 識別記号    | 庁内整理番号  | F I | 技術表示箇所 |
|----------------------------|---------|---------|-----|--------|
| C 0 7 K 7/06               | Z N A Z | 8318-4H |     |        |
| A 6 1 K 37/64              | A B U   | 8314-4C |     |        |
| C 0 7 K 5/08               |         | 8318-4H |     |        |
| 5/10                       |         | 8318-4H |     |        |
| // C 1 2 N 9/99            |         |         |     |        |

審査請求 未請求 請求項の数4(全 3 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-74581

(22) 出願日 平成3年(1991)3月14日

(71) 出願人 000000228

江崎グリコ株式会社

大阪府大阪市西淀川区歌島4丁目6番5号

(72) 発明者 岡田 茂孝

奈良県生駒市東生駒3丁目207-269

(72) 発明者 日下 要

大阪市平野区長吉出戸6丁目6-15

(72) 発明者 長森 陽一

大阪府吹田市末広町15-7-202

(54) 【発明の名称】 ジペプチジルカルボキシペプチダーゼを阻害するペプチド

(57) 【要約】

【目的】 食品の一部として摂取し、血圧を下げることを可能とする。

【構成】 アミノ酸がX-Pro-Y-Pro-Zの様に結合したペプチドであって、Yはアミノ酸、X及びZはそれぞれアミノ酸あるいはペプチドであるか、XまたはZはなくてもよい。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記構造を有することを特徴とするジベプチルカルボキシペプチダーゼを阻害するペプチド配

X-Pro-Y-Pro-Z

(ただし、XまたはZは欠落しているかまたはアミノ酸あるいはペプチドを表し、Yはアミノ酸を表す。)

【請求項2】 微生物の培養液より採取したことを特徴とする請求項1記載のジベプチルカルボキシペプチダーゼを阻害するペプチド。

【請求項3】 XがGly、YがPhe、及びZがIleであることを特徴とする請求項1記載のジベプチルカルボキシペプチダーゼを阻害するペプチド。

【請求項4】 Xが欠落またはGlyであり、YがPheであり、かつZがIleまたは欠落したテトラペプチドであることを特徴とする請求項1記載のジベプチルカルボキシペプチダーゼを阻害するペプチド。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、血圧上昇効果を有するジベプチルカルボキシペプチダーゼ（以下、DCPaseという）を阻害するペプチドに関するものである。

【0002】

【従来技術および課題】 DCPaseは、タンパク質やペプチド類のカルボキシ末端よりジベプチド単位でペプチド結合を加水分解する酵素である。この酵素の代表的なものとしては生体内のアンジオテンシン変換酵素（以下、ACEという）があげられる。

【0003】 ACEは体内においてデカペプチドであるアンジオテンシンIに作用して血圧の昇圧物質であるアンジオテンシンIIをつくり、また降圧物質ブラジキニンに作用してこれを不活性化させるため強い昇圧効果を発揮する。このため、ACEを不活性化することは、血圧上昇抑制に大きな効果があると期待される。

【0004】 一般にDCPaseを阻害する物質を取得する研究は昨今、さかに行われている。

【0005】 かような阻害物質を発見するには実験上、DCPaseを適当な基質に反応させ、その際各種の物質を添加してその阻害活性の有無を測定するという簡単な手順でよいので、微生物培養物のほか自然界に存在する各種の物質、合成ペプチドおよびその誘導体などいろいろなものについて研究されている。日常食品の中では茶の抽出物などが有効であるが、経口投与によっては、意外にも著しい血圧の低下は報告されていない。その理由は、おそらく体内への吸収が困難なためであろうと考えられる。体内に吸収され血管中を循環してはじめて降

圧効果が発揮されるからである。

【0006】 さて、タンパク質やその分解物であるペプチドを経口投与すると完全にアミノ酸に分解されていない高分子の状態でもよく吸収されることは広く知られている。そこでDCPaseに対して阻害活性を有するペプチドを経口投与すれば、これがそのまま体内に吸収され、血液中に混入することになり、DCPase阻害活性を示すことが期待される。

【0007】 DCPase阻害剤の検索に使用するDCPaseは普通、動物起源のものが使用されている。たとえば丸山らの文献ではウサギ肺起源のDCPaseが使用されている（Agric. Biol. Chem. vol 53, 1077-81, 1989他）。本発明者らは微生物にもDCPase生産菌が存在することを発見し、その酵素が作用の上でDCPaseに属するが、作用様式上は動物起源のものとなつたものであることを報告した（Agric. Biol. Chem. vol 54, 999-1005, 1990）。

【0008】 そこで微生物DCPaseの反応を阻害する物質を発見すれば、これまで報告されたものとはことなる全く新規の経口投与可能な阻害物質を発見できるかも知れないと考えた。

【0009】

【課題を解決するための手段】 各種の放線菌を中心とする培養液について微生物DCPase阻害活性を検索したところ数種の菌株の培養液が阻害活性を示した。そのうち、もっとも強力な活性を示すものを分離精製した。分離精製法は常法であり、たとえば後記する実施例1の如くである。これをアミノ酸シーケンサで分析したところGly-Pro-Phe-Pro-Ileであった。またペプチド合成装置によりGly-Pro-Phe-Pro-Ileを合成したところ、あきらかに微生物DCPase阻害活性を示した。また、非常に興味深いことにはウサギ肺由来のDCPaseに対しても、阻害活性を示すことを見いだした。微生物DCPaseに対するIC<sub>50</sub>は40μM、ウサギ肺由来DCPaseに対するIC<sub>50</sub>は200μMであった。

【0010】 Gly-Pro-Phe-Pro-Ileを合成するとき、同時にPro-Phe-Pro-Ile、Gly-Pro-Phe-Proを合成したがこれらのものは表1に示すように、いずれも阻害活性を示した。また作用はやや低下したがウサギDCPaseも阻害した。

【0011】

【表1】

|                     | ウサギ<br>DCPase | 微生物<br>DCPase |
|---------------------|---------------|---------------|
| Gly-Pro-Phe-Pro-Ile | +             | +++           |

4

+                      ++  
 +                      ++

＊【作用】これまでプロリンをふくむペプチドでDCP  
a. 8. 阻害活性を示すものとしては、

✻

Ala-Val-Pro-Tyr-Pro-Gln-Arg (CEI $\beta$ ,)

マトグラフィーであるTSK-ODS80T。カラムで  
単一ピークを与えたので純品であると結論した。

10 【0019】〔微生物DCPaseに対する阻害活性の測定法〕阻害活性は以下の方法により、測定した。サンプル液50 $\mu$ lにDCPase溶液50 $\mu$ lを加えて40℃で15分間保つ。その後10mMベンゾイル-L-グルタミン-L-アラニン-L-プロリン100 $\mu$ lを加えて40℃で60分間保ったあと1N塩酸で反応を停止する。この反応液中に生じたアラニン-L-プロリンをHPLCで測定する。この値をAとする。反応停止後にサンプル液を加えた溶液のアラニン-L-プロリン量をBとすると阻害率は、次式で表される。

20 【0020】阻容率 =  $(B-A) / B \times 100 (\%)$

【0021】 [ウサギ肺由来DCPase阻害活性測定]

(法) 阻害活性は以下の方法により測定した。サンプル液 50  $\mu$ l にウサギ肺由来 DCPase 溶液 50  $\mu$ l を加えて 37℃ で 15 分間保つ。その後 10 mM ベンゾイル-グリシルーヒスチジル-ロイシン 100  $\mu$ l を加えて 37℃ で 60 分間保ったあと 1 N 塩酸で反応を停止する。この反応液中に生じたベンゾイル-グリシンを HPLC で測定する。この値を A とする。反応停止後にサンプル液を加えた溶液のベンゾイル-グリシン量を B とすると阻害率は、

$$\text{阻害率} = (B - A) / B \times 100 (\%)$$

の式で表される。

[0022]

【発明の効果】 上述のように本薬物質はDCPaseを阻害するので血圧上昇を阻止し、体内血圧を正常に保つ効果を有している。しかも、経口投与が可能であり、通常摂取される食品中にこれを混入しておけば、知らず知らずのうちに血圧が正常化でき、さらに医薬品と異なり、連続摂取にも副作用がでない点、すぐれた効果をもつものといえる。

(51) Int. Cl.<sup>3</sup>

識別配号 片内整理番号

FI

### 技術表示箇所

**C 1 2 P 21/02**

A 8214-4B

(C 1 2 P 21/02

**C 1 2 R 1:07)**

C07K 99:00

AN - 1992-387722 [13]  
 AP - JP19910074581 19910314; JP19910074581 19910314; [Based on J04288098]  
 CPY - EZAK  
 DC - B04 D16  
 FS - CPI  
 IC - A61K37/64 ; A61K38/55 ; C07K5/08 ; C07K5/10 ; C07K5/103 ; C07K5/117 ;  
 C07K7/06 ; C07K99/00 ; C12N9/99 ; C12P21/02  
 MC - B04-C01A B12-F07 B12-G01B3 D05-C11 D05-H13  
 M1 - [01] F012 F423 G010 G013 G100 H1 H100 H181 H401 H441 J0 J011 J012 J1  
 J111 J371 L250 M280 M311 M312 M313 M314 M315 M321 M331 M332 M333 M340  
 M342 M343 M349 M371 M381 M391 M423 M510 M520 M521 M530 M531 M540 M620  
 M710 M903 M904 P526 P616 V814 V902 V911 V912 V921; 9247-27801-N  
 9247-27802-N 9247-27803-N; 9240-7  
 PA - (EZAK ) EZAKI GLICO CO  
 PN - JP4288098 A 19921013 DW199247 C07K7/06 003pp  
 - JP8019154B B2 19960228 DW199613 C07K7/06 003pp  
 PR - JP19910074581 19910314  
 XA - C1992-172184  
 XIC - A61K-037/64 ; A61K-038/55 ; C07K-005/08 ; C07K-005/10 ; C07K-005/103 ;  
 C07K-005/117 ; C07K-007/06 ; C07K-099/00 ; C12N-009/99 ; C12P-021/02 ;  
 (C12P-021/02 C12R-001/07) ; (C12P-021/02 C12R-001/07)  
 AB - J04288098 New peptide has structure of X-Pro-Y-Pro-Z (X or Z are opt.  
 present and form amino acid or peptide; Y forms amino acid), and can  
 inhibit dipeptidyl carboxypeptidase (DCPase), where the peptide is  
 collected from cultured soln. of microbe.  
 - Pref. X is Gly, Y is Phe and Z is Ile, or X is deleted or Gly, Y is  
 Phe, and Z is Ile or deleted tetrapeptide.  
 - USE/ADVANTAGE - These cpds. inhibit CDPase, because they inhibit  
 vasopressor activity, and can keep internal blood pressure normal.  
 Furthermore, oral administration is possible. Blood pressure can be  
 normalised, by mixing them in daily feeding food, and side effect does  
 not occur by continuous feeding them, different from drug.  
 - In an example, bacillus sp., strain sepd. from soil was cultured in  
 Wakoman medium. Cultured soln. was centrifuged to obtn. supernatant.  
 After pH of supernatant was adjusted neutral, it was purified by  
 Q-Sepharose, S-Sepharose, Seppack mini column (Waters Co.) and ODS  
 column. Structure of purified peptide was analysed by PQS-1 peptide  
 sequencer. The structure was determined as Gly-Pro-Phe-Pro-Ile(Dwg.0/0)  
 C - C12P21/02 C12R1/07 ;  
 - C12P21/02 C12R1/07  
 CN - 9247-27801-N 9247-27802-N 9247-27803-N  
 DRL - 9240-7  
 IW - NEW PEPTIDE OBTAIN BACILLUS SPECIES STRAIN INHIBIT DI PEPTIDYL CARBOXY  
 PEPTIDASE SO BLOOD PRESSURE REGULATE  
 IKW - NEW PEPTIDE OBTAIN BACILLUS SPECIES STRAIN INHIBIT DI PEPTIDYL CARBOXY  
 PEPTIDASE SO BLOOD PRESSURE REGULATE  
 NC - 001  
 OPD - 1991-03-14  
 ORD - 1992-10-13  
 PAW - (EZAK ) EZAKI GLICO CO  
 TI - New peptide obtd. from Bacillus sp. strain - inhibits di:peptidyl